

36 F 0
(16 B 67)

特 許 庁
特 許 公 報

特 許 出 願 公 告
昭 41-159
公 告 昭 41. 1. 8
(全 3 頁)

2-ケート-L-グルン酸の製造法

特 願 昭 37-42413
出 願 日 昭 37. 9. 28
発 明 者 望月一男
宝塚市伊子志字円国寺 159 の 5
同 神崎俊彦
宝塚市鹿塩字高丸 1 の 3 5
同 岡崎尚良
吹田市山田下 520
同 土居宗晴
同 所
同 奈良潔
西宮市神垣町 2 7
出 願 人 武田薬品工業株式会社
大阪市東区道修町 2 の 2 7
代 表 者 三木孝造
代 理 人 弁理士 松居祥二

発明の詳細な説明

本発明は2-ケート-L-グルン酸の製造法に関する。
2-ケート-L-グルン酸はビタミンCの合成中間体として有用なものであり、従来はたとえばL-ソルボースを硫酸の存在下アセトンで処理してジアセトンソルボースにし、これを酸化してジアセトン-2-ケート-L-グルン酸にする方法、5-ケート-グルコン酸を還元してイドン酸にし、これを微生物で酸化して2-ケート-L-グルン酸にする方法などが知られているが、これらはいずれも数工程を要し、操作が複雑となり、また収率の低下も免れず工業的には必ずしも有利な方法であるとはいえなかつた。

本発明者らはこのような事情に鑑み種々研究を行った結果、ソルボースより1工程で2-ケート-L-グルン酸を生成する方法を見出し本発明を完成した。

すなわち本発明はシュードモナス・エルギノーザに属する菌株をソルボース含有培地で培養するか、前記のごとき菌株の菌体処理物とソルボースを接触させることを特徴とする2-ケート-L-グルン酸の製造法である。

本発明方法においてはシュードモナス・エルギノーザに属する菌株またはこの菌株の菌体処理物が用いられる。

また上記のごとき菌類をたとえば紫外線や、X-線

照射、ナイトロジェンマスタードなどの変異剤による処理などによつて2-ケート-L-グルン酸生成能のすぐれた変異株を人工的に造成し、かかる変異株ないしはその酵素を使用してもよい。

菌種の判定はおおむねバージェ・マニユアル・オブ・デターミナティブ・バクテリオロジイ (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology)によつてなされるがその主要の性質は次の通りである。

シュードモナス・エルギノーザ

形態的性質

肉汁寒天斜面に30℃、24時間培養した菌体は0.5~0.6×1.5~2.4μのグラム陰性杆菌で通常1~数本の極毛を有し、一般に運動性を有する。

生理的性質

通常牛乳をベプトン化し、ゼラチンを液化し、硝酸塩を還元する。一方インドールおよび硫化水素は生産しない。酸素に対する態度は好気的で42℃においても繁殖する。またD-グルコースを酸化してD-グルコン酸、2-ケート-D-グルコン酸、その他を生産する。

バートン (Burton) 培地およびゲッザート (Gessard) 培地によく繁殖し両培地中あるいは、そのいずれかの培地中に青色色素ピオシアニン (N-メチル-1-ヒドロキシフエナジン) を生成するものが多い。

これら一般的な性質は菌株によつて多少の差異が認められることは微生物分類学上の常識であるが、ヘインズ (W. C. Haynes) が指摘しているように各菌株に共通した固定的性質として、(a) 41±1℃においても繁殖する。(b) D-グルコン酸カリウムを炭素源として振盪培養すると好収率で2-ケート-D-グルコン酸を生産する。(c) (b) を放置すると粘質物質を生成するなどの点を挙げるができる。

本発明方法において使用されうる菌株の選択は下記のごとき方法によつて行うこともできる。

すなわち、斜面培養より菌体を取り、適当な培地に接種する。培地組成の例としてはたとえば次のごときものでもよい。

- 1 ソルボース 2 %、グリセリン 0.01 %、ポリペプトン 0.05 %、コーンステープリカー 1 %、第一リン酸カリウム 0.03 %、第二リン酸カリウム 0.007 %、硫酸マグネシウム (7水和物) 0.001 %、第一硫酸鉄 (7水和物) 0.001 %、塩化ナトリウム 0.005 %。
- 2 ソルボース 2 %、酵母エキス 0.5 %

BEST AVAILABLE COPY

菌を接種した培地を 200 rpm ロータリーシェーカー中 28℃ で培養し、一定時間度に培養液を採取し、アンバーライト IR-120 (H 型) で処理後水飽和フェノールを使用してペーパークロマトグラフィーを行い公知の常法によつて発色を行うと 2-ケート-L-グルン酸は Rf 約 0.2 を示すのでこれによつて 2-ケート-L-グルン酸生成が知られる。なお、定量はソモジー・ネルソン法によつた。本発明方法においてはソルボーズを含有する培地に前記のごとき菌を培養してもよく、またソルボーズに前記のごとき菌の菌体処理物を作用させてもよい。

本発明の方法においては、培養は一般に酸化醗酵の様式によつて行ふのが好ましい。培地は通常液体培地が使用されるがもちろん固型培地でもよい。培養の手段としては静置培養でも通気攪拌培養でもよい。

細菌の成育に適當な栄養培地としては目的を達成しうるかぎり何ら特別の制限はなく、たとえば菌が同化しうる炭素源、窒素源、その他無機塩類、微量の栄養素などを適當に含有しているのが望ましい。

これらの栄養源としては微生物の培養に際して一般に用いられる諸種の物質が適宜に適用される。すなわち、窒素源としてはたとえばアンモニウム塩、硝酸塩類、コンスチープリカー、ペプトン、肉エキス、大豆粉、小麦粉、酵母エキス、酵母、尿素などの無機または有機の窒素含有物が挙げられ炭素源としては原料であるソルボーズがそのまま使用されるがその他補助炭素源としてたとえばグリセリン、蔗糖、乳糖、麦芽糖、デキストリン、糖蜜なども使用される。無機塩類としてはたとえばカルシウム塩類、マグネシウム塩類、カリウム塩類、亜鉛塩類、銅塩類その他の金属塩類などが用いられる。その他さらに必要に応じて目的物質生成促進因子などを添加してもよい。これらの各成分の配合割合、量などには用いる菌株の種類、原料の使用量、その他の条件などによつても異なり、個々の場合に依つて適宜に選択決定される。

培地中における原料ソルボーズの濃度は使用する菌株の種類などによつても異なるが、普通約 1~200 g/l 程度が用いられ特に約 5~50 g/l 程度が好ましい。

培養条件は、もちろん菌株の種類、培地の組成その他によつても異なり要するに目的物が最も効率よく生成されるように個々の場合に依つて選択すればよいことはいふまでもないが、たとえば培養温度は約 20~35℃、また培地の pH 値は約 3~9 程度に維持するのがよい。培養時間は普通約 20~200 時間がよく、この程度の培養で目的物の生産が最高に達する。原料ソルボーズは培養開始時に培地に添加してもよく、また培養途上の適宜の時期に培地に添加してもよい。

なお、培養中培地の pH 値を常に酵素活性に適した値に保持するため、場合によつては培養の進行にともなつて培地中に適宜の塩基性物質あるいは酸性物質を適當量添加混合してもよく、また培地中に予め適宜の緩衝剤を適當量添加混合しておいてもよい。

本発明方法においては前記のごとき菌体の菌体処理物とソルボーズを接触させてもよい。菌体処理物としてはたとえば菌体または菌体摩砕物にアセトンを添加したいわゆるアセトンパウダーなどの形態のものが好んで用いられるが、その他生菌の細胞体、凍結乾燥処理した菌の細胞体、それらの摩砕物なども同様に用いられる。なお、この場合の反応は前記の培養方法におけると同様の条件下で行ふこともできる。

また本発明者らの研究によると、本発明の方法において菌体処理物を用いる場合、その菌体の生産する酵素がソルボーズに接触して 2-ケート-L-グルン酸が生成されると考えられる。

かくして得られる反応生成物中から目的とする 2-ケート-L-グルン酸を、その性状を利用した適宜の手段で分離精製する。なお 2-ケート-L-グルン酸は遊離の酸として分離してもよく、たとえばナトリウム、カリウム、カルシウム、アンモニウムなどの塩として分離してもよい。

分離の方法としては目的を阻害しないかぎりいかなるものでもよいが、たとえば必要に応じて反応生成物から濾過、遠心分離あるいは活性炭処理などを行つて菌体を除去した後、この発酵生成物溶液をそのまま濃縮、再結晶などにより目的物を取り出す方法、溶媒で抽出する方法、たとえば活性炭、酸性白土、モレキュラーシーブ、イオン交換樹脂などの適宜の吸着剤と溶媒とを接触させ目的物を吸着剤に吸着させついで適宜の溶媒で脱着して精製する方法などを単独で、適宜に組み合わせ、あるいは反復適用することによつて行ふこともできる。

なお 2-ケート-L-グルン酸が遊離型で得られる場合にはこれを適宜の方法によつてたとえばナトリウム、カリウム、カルシウム、アンモニウムなどの塩にしてもよく、また塩として得られた場合はこれを適宜の方法によつて遊離型あるいは他の塩に変えてもよい。

本発明における 2-ケート-L-グルン酸の同定はたとえば元素分析、融点、赤外線吸収スペクトル、旋光度などの物理的性状によつても行いうる。

以上のごとき本発明の方法によれば、ソルボーズより一工程で 2-ケート-L-グルン酸を得ることができ、操作も簡単であり、収率も良好で工業的にきわめて有意義である。

実施例 1

下記の組成を有する培地 15 ml を 200 ml の三角フラ

スコに分注し、常法にしたがつて殺菌したものにシュードモナス・エルギノーザ IFO 3456 を接種し、200 rpm ロータリー・シエーカーにかけ 28℃ で培養を行つた。

培地組成

ソルボーズ 2%、グリセリン 0.01%、ポリペプトン 0.05%、コーンステープリカー 1%、第一リン酸カリウム 0.003%、第二リン酸カリウム 0.007%、硫酸マグネシウム (7水和物) 0.001%、硫酸第一鉄 (7水和物) 0.01%、塩化ナトリウム 0.005%。

培養の各時間に培養液を採取し、水飽和フェノールを使用してペーパークロマトグラフィーを行い、2-ケート-L-グロン酸相当部より該物質を水で抽出しシモジー・ネルソン法により定量を行つた。結果は以下の通りである。

培 養 時 間	24時間	48時間
2-ケート-L-グロン酸 r/mg	56	147
	72時間	96時間
	200	321

実施例 2

シュードモナス・エルギノーザ IFO 3898 の変異株を実施例 1 の培地 500 ml に接種し 140 spm レシプロカル・シエーカーで 28℃、20 時間培養する。

別に 200 l ステンレス培養タンクにソルボーズ 2%、酵母エキス 0.5% の組成を有する培地 100 l を用意し (120℃、20 分殺菌処理) 前記の培養液 1 l を接種し 280 rpm、28℃ 通気量 100 l/min で 120 時間培養した。

培養液を濾過し濾液をアンバーライト IR-200 (H 型) の樹脂に通し通過液をアンバーライト XE-168 に通して 2-ケート-L-グロン酸を吸着せしめる。これを 1/10 N アンモニア水で溶出し、溶出液を減

圧濃縮し、活性炭を加えて脱色処理後、処理液をアンバーライト IR-200 で処理して pH 1.5 にし水酸化カルシウムを加えて pH 6.0~6.5 にして濾過する。濾液を再びアンバーライト 200 で処理して pH 1.5 にし減圧濃縮して 2-ケート-L-グロン酸の結晶 273 g を得た。

この方法で得られた結晶を水から再結晶したものとそのメチル誘導体の融点、赤外部吸収スペクトルなどの物理的性質はソルボーズから合成法によつて得られた標準 2-ケート-L-グロン酸およびそのメチル誘導体のそれと一致した。

遊 離 酸

融 点: 165~166℃

元素分析値: $C_6H_{16}O_7 \cdot H_2O$ として

計算値 C: 34.01% H: 5.7%

実験値 C: 33.89% H: 5.61%

メチル誘導体

融 点: 155℃

元素分析値: $C_7H_{12}O_7$ として

計算値 C: 40.28% H: 5.62%

実験値 C: 40.21% H: 5.7%

実施例 3

実施例 1 の培地に下記の菌を培養し培養液のペーパークロマトグラフィー (展開剤: 水飽和フェノール) によつて 2-ケート-L-グロン酸の生成を認めた。

シュードモナス・エルギノーザ	IFO 3898
同	IFO 3901
同	IFO 3456

特許請求の範囲

1 シュードモナス・エルギノーザに属する菌株をソルボーズ含有培地で培養するか、これらの菌株の菌体処理物とソルボーズを接触させることを特徴とする 2-ケート-L-グロン酸の製造法。